

Efecto del Cloruro de Calcio en la Fermentación del Mosto de Agave *Tequilana Weber* Var. Azul

S. Íñiguez Gómez ^{#1}, N. Santiago Olivares ^{#2}, E. Martínez Orozco ^{#3}, J. J. Barba Franco ^{*4},
G. Rossi Márquez ^{*5}, J. Ocegueda González ^{#6}, N. J. Orozco Chávez ^{#7}

[#] Tecnológico Nacional de México: Instituto Tecnológico José Mario Molina Pasquel y Henríquez,
Unidad Académica Arandas, Jalisco, México.

^{*} Tecnológico Nacional de México: Instituto Tecnológico José Mario Molina Pasquel y Henríquez,
Unidad Académica Lagos de Moreno, Jalisco, México.

¹ samuel.iniguez@arandas.tecmm.edu.mx, ² norberto.santiago@arandas.tecmm.edu.mx,

³ edgardo.martinez@arandas.tecmm.edu.mx, ⁴ joel.barba@lagos.tecmm.edu.mx,

⁵ giovanna.rossi@lagos.tecmm.edu.mx, ⁶ jazminocegeda555@gmail.com,

⁷ orozco.chavez.3582@gmail.com

Resumen— Este estudio evalúa el efecto de diferentes concentraciones de cloruro de calcio (CaCl_2) en la fermentación del mosto de *Agave tequilana Weber* var. azul, con el objetivo de optimizar el rendimiento alcohólico y la actividad fermentativa de las levaduras. Se prepararon 4 tinas de fermentación inoculadas con levadura *Saccharomyces cerevisiae* y suplementadas con fosfato diamónico. Las concentraciones de CaCl_2 evaluadas fueron 0.05, 0.075 y 0.1 g/L, dejando una tina como control sin adición del compuesto. Durante cinco días se realizaron mediciones cada 12 horas de las variables de azúcares reductores totales y directos, °Brix, pH y rendimiento alcohólico. El diseño experimental fue de bloques completamente al azar con tres repeticiones, y los datos fueron analizados mediante ANOVA y prueba de Tukey. Los resultados dicen que la concentración de CaCl_2 no influye de manera significativa en la cinética de fermentación, así como en la eficiencia de la fermentación. Esta investigación pretende ayudar a la mejora de los procesos de fermentación del jugo de agave en la industria tequilera por medio de estrategias basadas en evidencia científica.

Palabras clave: azúcares reductores totales, catalizador, cinética de reacción, fermentación.

Abstract— This study evaluates the effect of different calcium chloride (CaCl_2) concentrations on the fermentation of *Agave tequilana Weber* var. azul must, with the aim of optimizing alcohol yield and the fermentative activity of the yeasts. Four fermentation vats were prepared, inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* yeast and supplemented with diammonium phosphate. The CaCl_2 concentrations evaluated were 0.05, 0.075, and 0.1 g/L, with one vat kept as a control without the compound. Over five days, measurements of total and direct reducing sugars, °Brix, pH, and alcohol yield were taken every 12 hours. The experimental design was a randomized complete block design with three replicates, and the data were analyzed by ANOVA and Tukey's test. The results indicate that CaCl_2 concentration did not significantly influence either the fermentation kinetics or the fermentation efficiency. This research aims to contribute to improving agave juice

fermentation processes in the tequila industry through evidence-based strategies.

Keywords— *Catalyst, Fermentation, Reaction Kinetics, Total Reducing Sugars.*

I. INTRODUCCIÓN

La producción de bebidas alcohólicas mediante la fermentación de sustratos derivados de diferentes plantas es una práctica ancestral que ha evolucionado significativamente gracias a los avances en tecnología y ciencia. Entre estas bebidas, el tequila ocupa un lugar especial debido a su denominación de origen y su importancia cultural y económica para regiones de México, en particular Jalisco. El proceso de elaboración del tequila involucra la fermentación del mosto de *Agave tequilana Weber* var. azul, un paso crítico que influye en la calidad y el rendimiento del producto final [1-2]. El mosto de agave contiene azúcares complejos y nutrientes que deben ser metabolizados por las levaduras durante la fermentación. Sin embargo, la composición química del mosto, así como las condiciones fisicoquímicas de la fermentación, pueden influir de manera significativa en la actividad de las levaduras y en la producción de etanol [3]. En este contexto, la adición de sales minerales, como el cloruro de calcio (CaCl_2), juega un papel importante en la regulación de las condiciones del medio fermentativo [4].

El calcio es un ion esencial que afecta diversos aspectos de la fisiología celular de las levaduras, incluidas la estabilización de la membrana celular, la actividad enzimática y la capacidad de respuesta al estrés osmótico [5-6]. La adición de calcio en forma de cloruro de calcio puede mejorar la viabilidad y la actividad fermentativa de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, la especie más utilizada en la industria tequilera. Por otro lado, las concentraciones excesivas de CaCl_2 pueden generar efectos inhibitorios sobre las células, debido a la alteración del equilibrio osmótico y el

potencial de membrana [7]. Este fenómeno subraya la necesidad de investigar las concentraciones óptimas que permitan maximizar la producción de etanol sin comprometer la salud celular. Además, en otros procesos fermentativos han mostrado resultados contradictorios en cuanto a la aplicación de calcio, lo que sugiere la importancia de realizar estudios específicos para cada tipo de sustrato y condición fermentativa.

A pesar de la importancia del calcio en procesos de fermentación, existe una falta de estudios sistemáticos que evalúen el efecto de diferentes concentraciones de cloruro de calcio en la fermentación del mosto de Agave tequilana Weber var. azul. El entendimiento limitado de los niveles óptimos de CaCl_2 que maximizan la producción de etanol sin efectos adversos representa un obstáculo para la optimización de la producción de tequila. El conocimiento disponible proviene principalmente de investigaciones en otros contextos fermentativos, como la elaboración de cerveza o procesos industriales de bioetanol, donde el impacto del cloruro de calcio ha mostrado ser variable según las condiciones específicas del medio [8-9]. Esta brecha en la investigación limita la capacidad de los productores de tequila para ajustar de manera efectiva los parámetros de fermentación, lo que podría traducirse en variaciones de calidad y eficiencia.

La necesidad de profundizar en la comprensión del papel del cloruro de calcio en la fermentación del mosto de agave, con el fin de optimizar los procesos de producción de tequila. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de CaCl_2 permitirá establecer parámetros más precisos que contribuyan a mejorar el rendimiento y la calidad del producto final, beneficiando tanto a los pequeños como a los grandes productores. El potencial impacto de los resultados de esta investigación radica en proporcionar un marco técnico y científico que permita la aplicación de protocolos de adición de sales optimizados. Además, este trabajo podría sentar las bases para futuras investigaciones relacionadas con el uso de otros compuestos minerales en procesos de fermentación alcohólica del tequila. En síntesis, la evaluación del efecto de diferentes concentraciones de cloruro de calcio en la fermentación del mosto de *Agave tequilana Weber* var. azul no solo busca llenar un vacío en la literatura existente, sino también contribuir a la mejora continua de los procesos productivos en la industria tequilera.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La recepción del mosto se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis de Alimentos y la medición del pH mediante un potenciómetro digital (Consort, C3030), grados brix mediante un sacarímetro de bulbo de vidrio graduado de rango 0 a 30 (VIRESA, TDM-241178) y temperatura con un termómetro de vidrio clase A de escala -20 a 110 °C (LAUKA, LAUKA04025).

Se prepararon 4 tinas de fermentación con 10 L de Jugo de Agave tequilana Weber Variedad Azul a 10.5 °Brix. El ajuste de los °Brix se llevó a cabo a través de las siguientes formulas y mediante la incorporación de agua desionizada o bidestilada.

$$A = \frac{C_i}{C_f} V_i - V_i \quad (1)$$

Donde:

C_i = °Brix iniciales del mosto

V_i = Volumen inicial del mosto (Litros)

C_f = °Brix deseados finales del mosto

A = Volumen de agua desionizada a incorporar (Litros)

También se ajustó el pH a 3.7 mediante la incorporación de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y la temperatura a 40°C. Se incorporó la levadura de la marca Saf-Instant en una concentración de 0.2 g/l de mosto en cada una de las 4 tinas de fermentación previamente preparadas.

El nutriente que se adicionó a cada una de las 4 tinas de fermentación incluyendo la tina blanca fue el fosfato diamónico (DAP) en una concentración de 0.3 g/L de mosto. Iniciando al extraer un litro de mosto e incorporarle el nutriente en polvo para ser disuelto, posteriormente se incorporó a las tinas de fermentación de 10 L. Posteriormente se incorporó la variable independiente, es decir, el cloruro de calcio (CaCl_2) en una concentración de 0.05, 0.075 y 0.1 g/L en las tinas de fermentación 1, 2 y 3, respectivamente; se dejó una tina 4 como blanco, es decir, sin incorporación de CaCl_2 .

Las variables de respuesta que se midieron en este estudio durante la fermentación del Jugo fueron azúcares reductores totales (ART), azúcares reductores directos (ARD), grados brix (°Brix), pH y rendimiento alcohólico (RA).

La determinación de ART y ARD fueron conforme a lo establecidos en la Norma Mexicana MNX-V-006-NORMEX-2019, Bebidas alcohólicas-determinación de azúcares reductores directos y azúcares reductores totales-método de ensayo (prueba); por su parte, la determinación de pH se llevó a cabo mediante un potenciómetro electrónico (Consort, C3030); el contenido de sólidos solubles se determinó mediante un refractómetro de 0-30 °Brix y el contenido alcohólico mediante un densímetro-alcoholímetro 0 a 20 °GL.; la técnica de determinación del contenido alcohólico fue basada en la Norma Mexicana NMX-V-013-NORMEX-2019, Bebidas alcohólicas-determinación del contenido alcohólico (por ciento de alcohol en volumen a 20 °C) (% Alc. Vol.)- método de ensayo (prueba).

Estos análisis se llevaron a cabo cada doce horas durante los 5 días de duración de la fermentación, iniciando en el tiempo cero o tiempo inicial; para hacer un total de 11 tomas. Esta actividad se llevó a cabo en cinco repeticiones durante las fechas previstas en el cronograma preliminar de actividades.

El diseño estadístico que se llevó a cabo fue bloques completamente al azar con tres repeticiones. El análisis de los resultados obtenidos se hizo mediante el paquete estadístico MINITAB16, al comparar y buscar diferencias entre las 3 concentraciones de cloruro de calcio y el blanco en las diferentes variables de respuesta estudiadas. Las variables con diferencias estadísticas en la ANOVA se tratarán con un análisis de comparación de medias Tukey.

III. RESULTADOS

Cinética de fermentación

Las figuras 1, 2 y 3 muestra una tendencia de degradación de azúcares muy similar en los cuatro tratamientos con respecto al tiempo, ya que cada uno de los puntos se superponen o quedan muy próximos entre sí, sin que se aprecie una separación consistente entre grupos. Esta caída no es lineal, sino que muestra una disminución más pronunciada entre las 25 y 65 horas, donde los °Bx bajan de ~10 a ~3, para luego estabilizarse en valores bajos hacia el final. El tipo de tratamiento no tuvo efecto diferenciador sobre el consumo de los azúcares sin importar la cantidad de CaCl_2 ; ya que, la disminución de °Bx parece depender principalmente del tiempo de proceso y no del tratamiento aplicado.

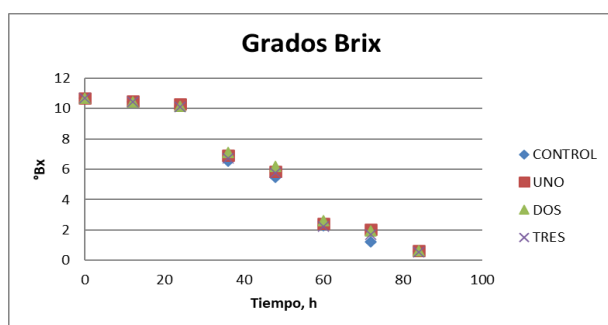


Fig. 1. Grados Brix en la cinética de fermentación de mosto de agave.

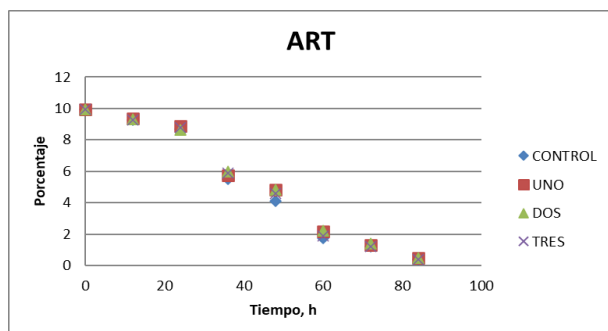


Fig. 2. Azúcares reductores totales en la cinética de fermentación del mosto de agave.

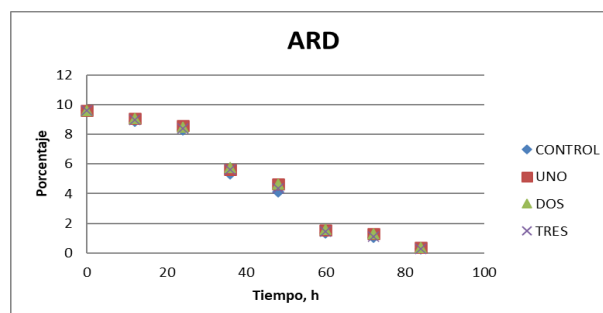


Fig. 3. Azúcares reductores directos en la cinética de fermentación del mosto de agave.

Riqueza Alcohólica

Se puede observar en la tabla 1 que la riqueza alcohólica generada en los cuatro tratamientos (C, 0.05, 0.075 y 0.1 g/L) tuvieron en promedio 5.31, 5.32, 5.38 y 5.37%, respectivamente; siendo la dosis de 0.075 g/L la que generó la mayor cantidad de alcoholes con 0.07% más que el tratamiento menor (grupo control). El análisis de varianza (ANOVA) muestra que no existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos con un valor de $p = 0.754$.

TABLA I

RIQUEZA ALCOHÓLICA EN LA FERMENTACIÓN DEL MOSTO DE AGAVE

Trat / Corrida	1ra	2da	3ra	4ta	5ta	Promedio ± DE
CONTROL	5.32%	5.31%	5.12%	5.50%	5.28%	5.31 ± 0.14%
UNO	5.51%	5.32%	5.10%	5.36%	5.31%	5.32 ± 0.15%
DOS	5.49%	5.38%	5.17%	5.43%	5.44%	5.38 ± 0.12%
TRES	5.43%	5.37%	5.18%	5.43%	5.43%	5.37 ± 0.11%

IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que, dentro del intervalo de concentraciones evaluado (0.05–0.1 g/L), el CaCl_2 no modificó de manera significativa ni la cinética de degradación de azúcares ni el rendimiento alcohólico final ($p = 0.754$).

Este resultado contrasta, en apariencia, con el papel fisiológico que se ha documentado para el calcio en la fisiología de las levaduras, donde este ion participa en la estabilización de la membrana plasmática, la modulación de enzimas Ca^{2+} -dependientes y la señalización asociada a la respuesta frente al estrés osmótico [5-6]. Sin embargo, la magnitud y el sentido de este efecto son altamente dependientes tanto de la concentración empleada como de la cepa de levadura utilizada. Pienasthika et al. [7] reportaron que el CaCl_2 favorece la floculación de *S. cerevisiae* solo bajo combinaciones específicas de concentración y pH; Chotineeranat et al. [8], trabajando con mieles de caña, observaron una mejora en el rendimiento de etanol únicamente dentro de un intervalo estrecho de concentración de calcio, mientras que dosis mayores no aportaban un beneficio adicional; y Nabais et al. [9] señalaron que el incremento en la tolerancia al etanol de *S. bayanus* inducido

por el calcio depende de la fase de crecimiento y de la concentración de azúcares del medio. En conjunto, estos antecedentes sugieren que las concentraciones utilizadas en el presente trabajo (0.05–0.1 g/L) pudieron ubicarse por debajo del umbral necesario para inducir una respuesta fisiológica detectable en las condiciones específicas del mosto de agave.

Asimismo, debe considerarse que el mosto de Agave tequilana Weber var. azul contiene de manera natural minerales, incluido calcio, provenientes del tejido vegetal y de los procesos de cocción e hidrólisis de la piña de agave. Es posible que la concentración basal de este ion en el mosto ya fuera suficiente para cubrir los requerimientos fisiológicos de las levaduras, lo que explicaría que la adición exógena de CaCl_2 , en las dosis aquí evaluadas, no representara una mejora adicional.

El patrón de degradación de azúcares observado en este trabajo —una fase de disminución más pronunciada entre las 25 y 65 h, seguida de una estabilización hacia el final del proceso— es congruente con el comportamiento cinético reportado para la fermentación de fructanos de Agave tequilana Weber var. azul por *S. cerevisiae*, en donde la velocidad de consumo de azúcares se ha asociado principalmente con la fase de crecimiento de la levadura, más que con la adición de compuestos minerales específicos [10]. Esta coincidencia entre estudios refuerza la idea de que la cinética de fermentación del mosto de agave está regida en mayor medida por la fisiología intrínseca de la levadura y la disponibilidad de sustratos fermentables que por la presencia de sales minerales adicionales, al menos en el intervalo de bajas concentraciones aquí evaluado.

Desde el punto de vista práctico, la ausencia de un efecto significativo del CaCl_2 sobre la cinética y la eficiencia de fermentación tiene implicaciones directas para la industria tequilera: al no observarse una mejora atribuible en el rendimiento alcohólico, la incorporación de este compuesto en las concentraciones evaluadas no se traduce en un beneficio técnico que justifique su costo, lo cual es congruente con el análisis económico planteado en la sección de conclusiones.

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la adición de cloruro de calcio (CaCl_2) no influye significativamente en la cinética de fermentación del mosto de Agave tequilana Weber var. azul. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento alcohólico final entre los tratamientos.

Bajo un punto de vista económico no sería viable el agregar CaCl_2 ya que sería un gasto innecesario para una producción en las condiciones de este estudio.

REFERENCIAS

- [1] M. C. Cedeño, “Tequila Production,” *Critical Reviews in biotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 1-11, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388559509150529>.
- [2] G. Hernández Cortés, J. O. Valle Rodríguez, E. J. Herrera López, D. M. Díaz Montaña, Y. González García, H. B. Escalona Buendía, and J. Córdoba, “Improvement on the productivity of continuous tequila fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* of Agave tequilana juice with supplementation of yeast extract and aeration,” *AMB Express*, vol. 6, no. 47, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0218-8>.
- [3] M. Bautista Justo, L. García Oropeza, J. Eleazar Barboza-Corona y L. A. Parra Negrete, “El Agave tequilana Weber y la producción de tequila,” *Acta Universitaria*, vol. 11, no. 2, pp. 26-34, 2001. [En línea]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/416/41611203.pdf>.
- [4] J. O. Valle Rodríguez, J. A. Córdova López y D. M. Díaz Montaña. “Influencia de la adición de nutrientes al jugo de *Agave tequilana*, en la fermentación con *Kloeckera Africana*,” [En línea] Disponible en: https://smbb.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJO_S/AREA_X/CX-21.pdf.
- [5] L. E. Segura García, “Caracterización de levaduras no-*Saccharomyces* para la producción de tequila con un perfil aromático específico,” Tesis de doctorado., Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, 2016. [En línea] Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=379406&orden=0&info=link>.
- [6] E. Jiménez Martí. Análisis de la respuesta de las levaduras a las condiciones de estrés osmótico y ausencia de nitrógeno durante la vinificación. Universitat de València, 2010. [En línea]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/52179/jimenez.pdf?se>.
- [7] M. Pienasthika, A. A. Brahmanti, I. Purwatiningrum, and A. K. Wardani, “A study of the effect of calcium chloride (CaCl_2) and pH on the flocculation ability of *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1195),” In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 475, no. 1, p. 012082. IOP Publishing, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/475/1/012082>.
- [8] S. Chotineeranat, R. Wansuksri, K. Piyachomkwan, P. Chatakanonda, P. Weerathaworn, and K. Sriroth. “Effect of calcium ions on ethanol production from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*,” *Sugar Tech* vol. 12, no. 2, pp. 120-124, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12355-010-0024-6>.
- [9] R. C. Nabais, I. Sá-Correia, C. A. Viegas, and J. M. Novais. “Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts.” *Applied and environmental microbiology*, vol. 54, no. 10, pp. 2439-2446, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.54.10.2439-2446.1988>.
- [10] J. L. Montañez, J. C. Victoria, R. Flores y M. Á. Vivar, “Fermentación de los fructanos del Agave tequilana Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol,” *Información Tecnológica*, vol. 22, no. 6, pp. 3-14, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000600002>.